RENDICONTI DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI
Classe di scienze fisiche, matematiche e naturali
Comunicazioni pervenute all'Accademia durante le ferie del 1913.
Estratto dal vol. XXII, serie 5ª, 2° sem., fasc. 2°. – Roma luglio 1913.

14

PROPRIETÀ CHIMICHE E CHIMICO-FISICHE

DEL

SUCCO DI MUSCOLI STRIATI E LISCI

NOTA II

CONTENUTO IN PROTEINE DEL SUCCO

E RAPPORTI

FRA GRANULI (MIOSINA) SOSPESI E MIOPROTEINA SCIOLTA

NOTA

DEL

Corrisp. F. BOTTAZZI e del dott. G. QUAGLIARIELLO



ROMA
TIPOGRAFIA DELLA R. ACCADEMIA DEI LINCEI
PROPRIETÀ DEL CAV. V. SALVIUCCI
1913



14.

Chimica fisica. — *Proprietà chimiche e chimico-fisiche del succo di muscoli striati e lisci.* Nota II. *Contenuto in proteine del succo e rapporti fra granuli (miosina) sospesi, e mioproteina sciolta* (1). Nota del Corrisp. F. Bottazzi e del dott. G. Quagliariello (2).

In un lavoro precedente (3) si rileva, che il contenuto totale in proteina del succo muscolare è quasi sempre assai piccolo e inferiore a quello del siero del sangue degli stessi animali. Esso, infatti, variava da un minimo di 2,67 % (muscoli lisci) a un massimo di 4,530 % (muscoli striati), lasciando da parte l'unico valore alto, trovato nel succo di muscoli striati di Dentex, che fu di 11,10 %. Essendo inverosimile che un così basso contenuto in proteine del succo dipendesse da basso contenuto dei muscoli in proteine spremibili al torchio idraulico, nacque in noi il sospetto che esso dipendesse piuttosto dal procedimento di triturazione delle masse muscolari, poichè la pressione, alla quale il succo è spremuto, raggiunge sempre lo stesso valore massimo, per successivi eguali aumenti graduali in ogni caso.

Dalle medesime ricerche resulta, inoltre, che nel succo muscolare spremuto al torchio idraulico di Buchner da muscoli freschissimi tritati in guisa da ridurli in una pasta per quanto era possibile omogenea, si trova una proteina sciolta, che abbiamo chiamato *mioproteina*, e un'altra, detta *miosina*, sospesa in forma di granuli minutissimi, invisibili al microscopio nel succo fortemente centrifugato, ma visibilissimi all'ultramicroscopio. Ora noi abbiamo tentato, colle presenti ricerche, di risolvere, sia il problema della separazione dei due materiali, basandoci sulle loro proprietà ampiamente descritte nel

(1) Lavoro eseguito nell'Istituto di fisiologia di Napoli.

(2) Pervenuta all'Accademia il 16 luglio 1913.

(3) F. Bottazzi e G. Quagliariello, Arch. intern. di fisiol., vol. XII, pp. 236, 289 e 409 (1912); ved. anche: Rendic. R. Accad. Lincei, serie 5a, vol. XXI, 2° sem., pag. 493 (1912).

citato lavoro, e della determinazione della proporzione in cui si trovano presenti in ciascuno dei succhi ottenuti, come anche l'altro che riguarda il contenuto in proteine totali del succo muscolare.

Naturalmente, avendo fatto in tutto otto esperimenti, non abbiamo trascurato di determinare, degli otto succhi ottenuti (3 di muscoli striati di cani, 4 di muscoli di bue, 1 di muscoli di cavallo), oltre al contenuto totale in proteine e al contenuto in materiale granulare per cento di carne e per cento di proteine totali, anche il peso specifico, la conduttività elettrica, il tempo di deflusso per lo stesso viscosimetro e sempre alla stessa temperatura, il contenuto in azoto totale, il residuo secco e le ceneri.

Per risolvere il primo problema, abbiamo provato a variare notevolmente la quantità e la qualità della *sabbia di quarzo*, che si aggiunge alla poltiglia muscolare quale la si ottiene dal tritacarne prima di pestarla nel mortaio, senza variare molto la quantità di *polvere di diatomee* (Kieselguhr), che da ultimo si aggiunge alla pasta, già contenente la sabbia di quarzo, per un'ulteriore e definitiva pestatura.

Il succo muscolare, cioè il liquido che si ottiene spremendo al torchio idraulico la pasta formata di muscolo tritato e di sabbia di quarzo e polvere di diatomee, ha evidentemente una composizione assai complessa e variabile. Esso resulta in parte della linfa che imbeve le strutture colloidali del muscolo, tanto quelle che costituiscono la sostanza muscolare propriamente detta, quanto le strutture connettivali ed elastiche di sostegno (perimisio esterno ed interno, sarcolemmi ecc.); e in parte del contenuto fluidificato delle fibre muscolari. I sarcolemmi essendo, come si sa, membrane elastiche asssi resistenti, si comprende che, spremendo a una certa pressione una massa di fibre muscolari quasi tutte integre, si otterrebbe principalmente un succo contenente la linfa che imbeve queste fibre, e oltre ad essa una certa quantità di contenuto di fibre muscolari, propriamente di quelle il cui sarcolemma sarebbe stato rotto dalla stessa spremitura. Se invece il sarcolemma è rotto e tagliuzzato durante la pestatura da quei minutissimi e taglientissimi coltelli che sono i granellini della sabbia di quarzo e della polvere di diatomee, si comprende che all'atto della spremitura il contenuto delle fibre passerà nel succo in tanto maggior quantità, quanto maggiore sarà stato il numero dei sarcolemmi rotti. Di conseguenza, poichè è nell'interno delle fibre muscolari che si trovano proteine in concentrazione relativamente alta (più alta che nel siero del sangue), si comprende che il succo muscolare dovrà essere tanto più ricco in proteine quanto più e quanto in maggior numero rotte e tagliuzzate sono state le fibre muscolari.

Mantenendo approssimativamente costante la durata della pestatura in mortaio, abbiamo, dunque, scelto una sabbia di quarzo (di Kahlbaum) più fine di quella usata nelle nostre ricerche precedenti, e ne abbiamo fatto variare la quantità aggiunta, da un minimo di grammi 100 a un massimo di grammi 370 per 100 grammi di poltiglia di muscoli tritati al tritacarne, mentre la polvere di diatomee variò, da un minimo di grammi 7 a un massimo di grammi 11 per 100 grammi di poltiglia muscolare (¹). La pressione massima esercitata sulla pasta fu sempre la stessa, cioè di 350 atmosfere indicate dal manometro (500 atmosfere circa in corrispondenza dell'asse dello stantuffo), la quale fu raggiunta in ogni caso gradatamente, cioè per aumenti successivi di 50 atmosfere. Il succo

(¹) Si noti, che la sabbia di quarzo essendo molto pesante e la polvere di diatomee invece molto leggera, alla grande differenza nel peso fra le due polveri aggiunte non corrisponde un'eguale differenza nel volume.

muscolare totale fu raccolto in vasi asciutti e subito pesato, per poter fare la determinazione del rendimento (quantità in peso di succo ottenuto per 100 grammi di carne). Quindi fu centrifugato per 1 ora a 4000 giri al minuto nella grande centrifuga del Laboratorio di fisiologia; raccolto in altro vaso asciutto, e conservato nella ghiacciaia, finchè non furono eseguite tutte le ricerche e le determinazioni sopra indicate.

Per quanto riguarda il secondo problema, procedemmo nel seguente modo.

Dalle nostre ricerche precedenti risulta, che il materiale granulare contenuto nel succo se ne separa, sia spontaneamente o per dialisi, ma in un tempo relativamente assai lungo; come anche quando si riscalda il succo a bagno-maria a una temperatura dai 35° ai 50° C., ma in questo modo assai più rapidamente. Non avevamo, quindi, da esitare, e scegliemmo, per accelerare il processo di agglutinazione dei granuli, la temperatura di 48° C., come quella che era sufficientemente alta per determinare la totale agglutinazione in un tempo relativamente breve (circa 30'), ma non tanto alta da provocare la coagulazione della mioproteina sciolta, la quale non s'inizia, in modo apprezzabile, se non oltre i 55° C.

Avremmo potuto anche diluire il succo originale con soluzione 1 °/₀ di cloruro sodico, al fine di accelerare sempre più la precipitazione dei granuli diminuendo la viscosità del liquido di sospensione; ma, dopo qualche tentativo, ci attenemmo al procedimento più semplice del riscaldamento del succo originale, per non alterare la composizione chimica di questo.

Riscaldato il succo a temperatura costante di 48° C. per 30', lo lasciammo raffreddare spontaneamente, e quindi buttammo su un filtro di peso noto la poltiglia. Tolto via il filtrato limpidissimo (che, per altro, presentò sempre all'ultramicroscopio un certo numero di granuli brillanti sfuggiti all'agglutinazione e alla filtrazione), lavammo abbondantemente il precipitato sul filtro con soluzione 1 °/₀ di NaCl, al fine di sottrarre ai granuli ogni traccia di mioproteina (non si può lavare da principio con acqua distillata, perchè questa precipita la mioproteina). Quando il filtrato non presentava più tracce di proteina coagulabile al calore o dimostrabile coi più sensibili reagenti delle sostanze proteiche, incominciammo a lavare il precipitato sul filtro con acqua distillata, e continuammo finchè il filtrato non desse più col nitrato d'argento la reazione di cloro. Il precipitato, insieme col filtro, era quindi disseccato nella stufa a 120° C. fino a costanza di peso, quindi pesato definitivamente: sottratto il peso del filtro, si aveva così il peso del materiale granulare secco contenuto in una quantità nota di succo muscolare originale; la differenza era costituita dagli altri materiali sciolti nel succo, principalmente dalla mioproteina. Conoscendo il residuo secco totale del succo, e il contenuto di questo in ceneri totali, sottraendo queste da quello, si aveva il contenuto del succo in materie organiche (principalmente proteine); e si poteva anche calcolare quanta parte del residuo secco totale, diminuito delle ceneri, spettasse al materiale granulare.

Nella seguente tabella sono raccolti i dati numerici da noi ottenuti. Dall'esame di essi resulta quanto segue:

TABELLA I.

Num. delle esperienze	Data	Animale	Sabbia di Quarzo	Polvere di Diatomee	Rendimento °/o gr. carne	Peso specifico	K_{25°	t_{25°	Proteine totali °/o gr.	Proteine precipitabili a 48°C. °/o gr. carne	Proteine precipitabili a 48°C. °/o gr. prot. totali	Azoto totale °/o gr.	Residuo secco °/o gr.	Ceneri °/o gr.
			°/o gr. carne											
I	1913, III, 1	Bue	140	11	52.3	1.042	0.0132	6′35″	6.98	—	—	1.48	11.7	—
II	" III, 3	Cane	240	10	37.7	1.046	0.0109	8′11″	9.54	5.98	61	1.80	15.2	—
III	" III. 10	"	370	11	32.7	—	—	—	9.14	—	—	—	14.93	1.43
IV	" III, 26	"	250	7	43.3	—	—	—	7.99	—	—	—	12.4	1.20
V	" IV, 5	Cavallo	240	9	51.1	1.043	0.0113	5′53″	8.42	3.83	45	—	13.3	1.27
VI	" IV, 12	Toro	135	10	57.4	—	—	—	5 32	2.29	43	1.40	10.2	—
VII	" IV, 19	"	140	10	57.7	1.041	0.0126	4′19″	6.73	2.42	36	1.64	12.1	—
VIII	" V, 10	"	100	11	41.3	—	0 0125	4′13″	6.86	2.26	33	1.45	10.6	—

1. Nelle nostre ricerche il contenuto in sostanze proteiche totali di tutti i succhi esaminati è risultato sempre, e spesso notevolmente superiore a quello trovato da noi nelle precedenti ricerche. Esso ha variato da un minimo di 5,32 a un massimo di 9,54 %. Particolarmente degno di nota è il fatto, che il contenuto maggiore in sostanze proteiche da noi trovato (7,99-9,14-9,54 %) corrisponde a quegli esperimenti, nei quali fu adoperata una maggiore quantità di quarzo (gr. 240-370) per 100 gr. di carne muscolare tritata. È anche vero, però. che un contenuto di sostanze preteiche relativamente alto (6,86-6,98 %) fu trovato altresì in casi, nei quali fu adoperata una quantità di sabbia di quarzo notevolmente minore (100-140 gr. per 100 gr. di poltiglia muscolare). Può darsi, quindi, che non solo la quantità, ma anche la qualità, cioè la maggior finezza della sabbia da noi usata in queste esperienze, influisca sul contenuto in proteine del succo muscolare. C'è poi un altro fattore, che non deve trascurarsi, e questo è la durata della pestatura e la forza con cui si pesta; fattore che, come è facile intendere, non può mantenersi costante. Comunque sia, si può supporre che, ove si raggiungesse una proporzione *optimum* fra sabbia di quarzo assai fine e poltiglia muscolare, e la pestatura fosse fatta in modo e per un tempo tale da determinare la rottura e il massimo sminuzzamento di tutte le fibre muscolari, si otterrebbe un succo muscolare ancora più ricco di sostanze proteiche che non sia il più ricco fra quelli da noi ottenuti.

Abbiamo ricordato sopra, che fra i succhi da noi preparati precedentemente, uno solo, il IX°, fu trovato straordinariamente ricco di proteine. Se si considera, però, che durante la spremitura potè appena essere raggiunta la pressione di 50 atmosfere, perchè a pressioni maggiori la carta avvolgente la pasta si rompeva, si comprende che il detto succo doveva contenere frammenti di fibre muscolari sfuggite per le lacerazioni del filtro, e che a ciò deve essere attribuito l'abnorme contenuto in proteine, e non a proteine sciolte o sospese in forma di granuli ultramicroscopici. Nè vale il dire che anche questo succo fu centrifugato. Data la grande viscosità del succo, i piccoli frammenti di fibre muscolari rimasero certamente in grande numero sospesi. Nel nostro lavoro, infatti, si legge: « Le suc centrifugé. mais il se montra trouble, même après centrifugation prolongée » (loc. cit., pag. 295).

Non fu, dunque, tanto la bassa pressione, quanto la lacerazione del filtro, che determinò l'uscita d'un succo più concentrato; e la maggior concentrazione era dovuta a frammenti di fibre muscolari passati per il filtro rotto, non a maggior contenuto in miosina e mioproteina del succo.

Noi abbiamo già dimostrato che il succo spremuto alla pressione di 50 atmosfere è più ricco di proteine di quello spremuto successivamente a 350 atmosfere dalla stessa pasta muscolare, e ne abbiamo anche dato le ragioni (loc. cit. pp. 301-302). Ma le differenze, che del resto si trovano

anche nei resultati di esperimenti analoghi fatti da Andrè [1] su organi vegetali, sono piccole e non paragonabili con quella che noi trovammo fra il succo di muscoli di Dentex e il succo di altri animali.

2. Ma il fatto più importante, che resulta dalle presenti ricerche, consiste nella possibilità di separare i due materiali proteici, onde è quasi interamente costituita la totalità delle sostanze proteiche del succo muscolare. Il metodo per la separazione è, come sopra è detto, semplicissimo; e si fonda sulla insolubilità dei granuli sospesi nel succo, fatti di miosina, sia in soluzioni di sali neutri come in acqua distillata. Naturalmente, date le dimensioni ultramicroscopiche dei granuli elementari, è inevitabile la perdita di una certa quantità di materia granulare, durante le filtrazioni, per quante volte si faccia passare il liquido filtrato per lo stesso filtro, poichè l'agglutinazione dei granuli in grani e grumi di dimensioni microscopiche o macroscopiche non è mai completa. Forse, se avessimo voluto agevolare l'agglutinazione termica con qualche reagente chimico, per es. con una traccia di acido o con poca soluzione concentrata di un sale neutro, o con tutti questi reagenti insieme, avremmo ottenuto resultati più somiglianti nei varii esperimenti. Ma non si volle far ciò, principalmente perchè noi ci eravamo anche prefisso lo scopo di adoperare le masse granulari così raccolte e insieme unite per ricerche di composizione chimica e chimico-fisiche da fare su esse in seguito, e quindi evitammo l'aggiunta di sostanze, che sarebbero state certamente in parte trattenute per assorbimento o per combinazione chimica dai granuli, dai quali perciò sarebbe stato poi difficile eliminarle.

Per le dette ragioni, i valori da noi ottenuti sono da ritenersi solo come approssimativi. Esaminando, ora, questi valori, si vede che la massa granulare costituisce dal 33 al 61 % delle proteine totali contenute nel succo; essa presenta, dunque, variazioni quasi del doppio, che, almeno in parte, debbono essere dovute a cause d'errore inerenti al metodo. Se, però, si tralascia il valore più alto, che è anche unico, del 61 %, gli altri valori presentano variazioni assai minori, cioè dal 33 al 45 %. Tuttavia, può essere anche invocata un'altra causa della differenza di contenuto in materiale granulare dei varii succhi: essa è la provenienza di questi, sia per quanto riguarda la specie animale, come per quanto si riferisce alla specie dei muscoli spremuti. Dai valori ottenuti resulta che i muscoli di toro sono quelli che dànno la minor quantità relativa di materiale granulare per 100 di proteine; viene poi la muscolatura di cavallo, e finalmente quella di cane, che dà la quantità maggiore. Ora, i succhi muscolari di cane sono sempre più concentrati (contenuto in proteine totali: 7,99-9,54 % di succo) di quelli

[1] G. André, *Sur la composition des sucs végétaux extraits des tiges et des feuilles.* Compt. Rend. Acad. d. Sc. de Paris, tom. 144, pag. 276 (1907). Ved. anche: Ibidem, tom. 145, pag. 1349 (1907).

di bue o di toro. D'altro canto, può darsi benissimo che nei muscoli striati di bue o di toro, animali caratterizzati da movimenti lentissimi, le fibrille striate, dalle quali noi supponemmo che il materiale granulare derivi, siano più scarse di numero, relativamente al sarcoplasma, che non siano nei muscoli dei cani, i cui movimenti sono, come ognuno sa, agili e lesti.

Non molte, nè sistematiche sono le ricerche istologiche, che sono state fatte sulla fibrillatura degli elementi muscolari nelle diverse specie di mammiferi, ma si sa che differenze notevoli esistono, a tale riguardo. Noi abbiamo, però, il modo di risolvere il problema, se vi sono muscoli che dànno un succo notevolmente più ricco di materiale granulare, ed altri che ne dànno uno meno ricco; e se la differenza, ove realmente esistesse, fosse dovuta al fatto che le fibre dei primi, in confronto con quelle dei secondi, contenessero per unità di superficie di sezione un numero di miofibrille maggiore, relativamente al sarcoplasma.

I muscoli rossi sono, come si sa, più ricchi di sarcoplasma, i muscoli chiari, più ricchi di miofibrille. Ora noi ci proponiamo, appunto, di ottenere succhi di muscoli rossi e di muscoli bianchi di una stessa specie di animali, per es. di conigli, o di polli; succhi preparati nelle identiche condizioni (con la stessa quantità di sabbia di quarzo, pestatura di eguale durata e intensità, pressioni identiche ecc.), per vedere se il loro contenuto in proteine totali per cento di succo, e il contenuto di questo in materiale granulare per cento di proteine, sia lo stesso o differente.

Intanto non crediamo debba senz'altro ammettersi come casuale il fatto, che il minimo contenuto in proteine totali e in materiale granulare spetti sempre ai succhi di muscoli di bue, e il massimo al succo muscolare di cane; come non può non impressionare la corrispondenza del minor contenuto in materiale granulare col carattere lento e pigro dei movimenti del bue, e il maggiore con l'agilità e prestezza delle contrazioni muscolari del cane.

Una differenza analoga nel carattere dei moti muscolari si riscontra fra il rospo (*Bufo vulgaris*) e la rana (*Rana esculenta*). Ebbene, si sa che i muscoli del primo sono prevalentemente rossi, e, quindi, più ricchi di sarcoplasma; mentre quelli della rana sono prevalentemente bianchi e più ricchi di miofibrille striate.

Un'altra indagine, che può gettar luce sul problema, e che non abbiamo potuto sinora fare, ma che faremo certamente in seguito, è quella di confrontare il contenuto in materiale granulare del succo di muscoli striati col contenuto in materiale granulare del succo di muscoli lisci dello stesso animale. Noi abbiamo già dimostrato che succo contenente granuli ultramicroscopici si può ottenere in grande quantità dai muscoli retrattori del pene di bue, cioè da muscoli lisci tipici, che si possono avere dal macello a chilogrammi. Dovendosi supporre che le miofibrille siano relativamente scarse nei muscoli lisci, il succo di questi dovrebbe presentare un contenuto in mate-

riale granulare scarso per cento di proteine totali. Le indagini che ci proponiamo fare a questo proposito, diranno se tale supposizione sia esatta.

3. Dalla tabella resulta, inoltre, che il rendimento in succo variò da un minimo di 32,7 a un massimo di 57,7 grammi per 100 grammi di carne spremuta; e che il peso specifico dei succhi presentò piccolissime oscillazioni: minimo 1,041; massimo 1,046. Il massimo peso specifico corrisponde al succo più concentrato; il minimo, a uno dei meno concentrati. Nessuna relazione, invece, può scorgersi fra il rendimento e la concentrazione proteica dei varii succhi.

4. La viscosità (più precisamente, il tempo di deflusso dei varii succhi sempre per lo stesso capillare viscosimetrico e alla stessa temperatura) decorre parallelamente al contenuto in proteine totali; il che s'intende agevolmente, senz'altro comento.

5. Facilmente intelligibile è anche il fatto, che il contenuto in azoto totale e in residuo secco e in ceneri varia parallelamente al contenuto in proteine totali.

6. Se dal residuo secco si sottrae il contenuto in proteine totali, si ha una differenza che è notevolmente superiore al contenuto in ceneri totali. Per es., nell'esperimento III, essendo il residuo secco = 14,93 $^0/_0$, e il contenuto proteico = 9,14 $^0/_0$, si ha una differenza = 5,79 $^0/_0$, mentre il contenuto in ceneri è solamente 1,43 $^0/_0$. La differenza fra queste due ultime cifre, che è di gr. 4,36 $^0/_0$, non può essere interamente imputata a perdite verificatesi durante l'incinerazione. Essa è imputabile, in massima parte, alle sostanze organiche non proteiche (glicogeno, glicosio e altri idrati di carbonio, grassi e lipoidi, urea, creatina, basi puriniche e altre sostanze estrattive), contenute in ogni succo muscolare.

Il materiale da noi raccolto in notevole quantità durante queste ricerche è stato utilizzato per indagini chimico-fisiche, i cui resultati saranno prossimamente pubblicati.
